



FIND-IT IBR - BLV



SISTEMA PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DEL VIRUS DE LEUCOSIS BOVINA (BLV) Y EL HERPESVIRUS BOVINO TIPO I O RINOTRAQUEITIS INFECCIOSO BOVINO (IBR), POR PCR EN TIEMPO REAL EN UN SOLO PASO.

FIBR - LB 50 - Sistema para **50** reacciones

FIBR – LB 100 - Sistema para **100** reacciones

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

FIND-IT IBR – BLV es un sistema basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-TR) para detectar y cuantificar simultáneamente la presencia del virus de IBR y LB. El ensayo emplea como blanco de amplificación la región más conservada del virus de IBR que es la Glicoproteína B (gB) y un segmento de la Polimerasa viral (pol) del virus de la LB.

FIND-IT IBR – BLV incluye iniciadores y sondas TaqMan, así como los reactivos que permiten amplificar, detectar y cuantificar el virus de la IBR. El sistema emplea ADN obtenido de tejidos, suero, sangre o cultivos celulares. Únicamente se requiere agregar el ADN purificado de su muestra a la mezcla de reacción.

Este sistema resulta extremadamente confiable, gracias a la incorporación de un **control interno** que permite monitorear la presencia de sustancias inhibitorias y **descartar falsos negativos**. Así mismo se incluye un **control estándar** para **cuantificar el número de moléculas** o como control positivo.

El virus de IBR es un herpesvirus. Su genoma consiste de un ADN de doble cadena de una longitud aproximada de 140 kb. Tres glicoproteínas principales, gB, gC, y gD inducen respuestas inmunes de neutralización.

El IBR produce trastornos respiratorios y reproductivos y trastornos multisistémicos en los terneros jóvenes. Las infecciones del tracto respiratorio producen fiebre, secreción nasal entre serosa y mucopurulenta, lesiones necróticas en la nariz, conjuntivitis, inapetencia y reducción de la producción lechera. Igualmente pueden producirse abortos después de la etapa de la infección respiratoria. El IBR también produce vulvovaginitis pustular infecciosa y balanopostitis. Los toros pueden secretar el virus en el semen tanto durante la infección clínica como la subclínica.

El virus de la Leucosis Bovina (BLV), es un miembro oncogénico del género *Deltaretrovirus* de la familia *Lentivirus*. La mayoría de los animales infectados por este virus nunca muestran signos hemáticos de infección y se convierten en portadores asintomáticos del virus. Sólo del 5 al 10% de los animales infectados, desarrollan linfosarcoma maligno monoclonal de células B. Con distribución mundial, la leucosis bovina está enlistada en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una enfermedad de importancia para el comercio internacional y está incluido en programas nacionales de erradicación en Australia y en algunos Estados miembros de la Unión Europea, recientemente varias de los cuales han eliminado la enfermedad. En contraste, el 89% de los rebaños lecheros en los Estados Unidos se reportan estar infectados y las pérdidas económicas se han estimado en 525 millones de dólares anuales por disminución en el rendimiento lácteo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La PCR-TR es una herramienta de diagnóstico molecular sensible, específica y robusta. Este sistema, se basa en la amplificación selectiva de un segmento del genoma viral por PCR y su detección específica mediante una sonda TaqMan. La sonda al hibridar con el producto de amplificación, es degradada generando fluorescencia en el momento que ocurre la amplificación (en tiempo real). Esta fluorescencia es detectada por un equipo termociclador de tiempo real, que posee un sistema óptico de detección de fluorescencia.

La sonda TaqMan, es un oligonucleótido que posee dos moléculas (reportera-fluorescente y apagadora) que están colocados en los extremos (5' y 3', respectivamente), en ésta condición no se genera fluorescencia ya que la molécula apagadora está inhibiéndola. Cuando la sonda hibrida específicamente de forma complementaria al producto de amplificación, ésta es degradada por la acción 5' exonucleasa de la ADN Taq polimerasa. Cuando esto sucede, se separa la molécula reportera fluorescente alejándose de la actividad apagadora de la otra molécula, generándose fluorescencia. La sonda se une específicamente al producto de amplificación, lo cual hace al sistema sumamente específico y sensible.

CONTENIDO DEL SISTEMA

- 1.- Super Mix RT-PCR-TR 2X* (500µl) (oligonucleótidos y sondas TaqMan, ADNTaqPolimerasa, amortiguador, dNTP`s, MgCl₂ y H₂O). 50 reacciones/vial.
- 2.- ADN control estándar de cuantificación para IBR * (1ng/µl = 3.06 X 10⁸/µl) y BLV (1ng/µl = 2.99 X 10⁸/µl) (50µl).
- 3.- H₂O (500 µl).

El sistema contiene iniciadores y sonda TaqMan para amplificar un control interno que permite monitorear la presencia de sustancias inhibitorias y descartar falsos negativos.

El sistema también incluye ADN control estándar que permite construir una curva de referencia para cuantificar de forma absoluta el número de copias virales presentes en la muestra.

*Almacenar a -20°C

La sonda TaqMan para la detección del virus de IBR está marcada con Cal Fluor Red 610/BHQ2 (naranja), para el virus de la BLV está con HEX/BHQ1 (amarillo) y la del control interno está con FAM/TAMRA (verde).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- 1.- Añada hasta 10 µl de la muestra de DNA en un tubo. Cuando sea necesario complemente a un volumen de 10 µl con H₂O.
- 2.- Añada 10 µl de la Super Mix PCR-TR 2X
- 3.- Someta el tubo a amplificación-detección en un equipo termociclador de Tiempo Real. Programación del equipo: **95°C por 10min, 40 ciclos de 95°C por 15seg y 60°C por 45seg.**

Asegúrese que el equipo detecta en los canales 495 -520 nm (verde), 535 - 556 nm (amarillo) y 585 - 610 nm (naranja).

CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GENOMA VIRAL

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de IBR, se recomienda amplificar 4 diferentes cantidades conocidas del ADN control estándar. Para esto, se deben realizar 4 diluciones decuples seriadas, a partir del ADN control estándar proporcionado (1 ng/ul). Por lo que se colocan en 4 tubos 45µl de H₂O y se toman 5µl del ADN control estándar, agregándolo al primer tubo, se homogeniza la mezcla utilizando un agitador tipo vortex y se toman 5µl para agregarlo al 2º tubo y así sucesivamente. Para realizar la curva estándar de amplificación, se toman 10µl de cada dilución, se le agregan 10µl de la Super Mix RT-PCR-TR y se somete a las condiciones recomendadas de amplificación. Es importante incorporar un control negativo, en donde solo se agrega 10µl de agua a la superMix-TR 2X. Estos ensayos es recomendable hacerlos por duplicado.

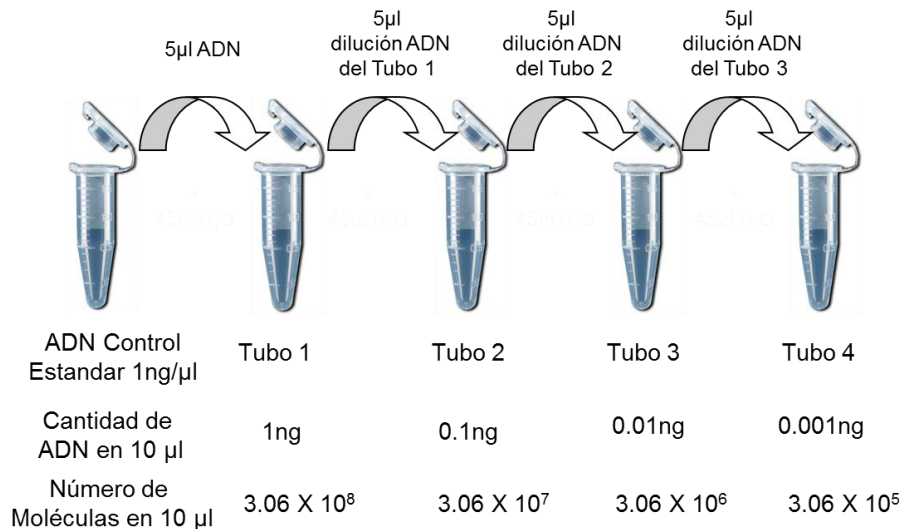


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

ANÁLISIS DE DATOS

Una muestra es considerada positiva siempre que la fluorescencia emitida sea mayor a la de los controles negativos.

Una muestra es considerada negativa siempre que la fluorescencia emitida sea menor o igual a la de los controles negativos.

Una muestra puede ser cuantificable siempre que la fluorescencia emitida se encuentre en el rango de fluorescencia de la curva estándar.

Material Requerido No Proporcionado

- Kit para la extracción de DNA
- Micropipetas y puntas
- Vortex
- Microtubos para PCR-TR
- Termociclador en Tiempo Real.

Extracción de ADN

Siga las recomendaciones del kit o técnica de extracción de ADN de su preferencia.

BIBLIOGRAFIA

Deregt. D. Rinotraqueitis infecciosa bovina y diarrea viral bovina: Repercusiones en la Salud Animal y el Comercio Internacional. OIE 1998, 147-156.

Kettmann R, Portetelle D, Mammerickx M, Cleuter Y, Dekegel D, Galoux M, Ghysdael J, Burny A, Chantrenne H (1976) Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. Proc Natl Acad Sci USA 73:1014–1018

Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D (1994) Bovine leukaemia virus. In: Levy JA (ed) The retroviridae. Plenum Press, New York, pp 39–81.

Ott SL, Johnson R, Wells SJ: Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. Prev Vet Med 2003, 61:249-262.

http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapter_1.11.11.htm.2

<http://nahms.aphis.usda.gov/dairy/dairy96/DR96blv.pdf>